

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

**Az α -melanocita stimuláló hormon gyulladáscsökkentő hatása
biológiai gátrendszerek tenyészetes modelljein**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Harazin András

Témavezetők:

Dr. Deli Mária, tudományos tanácsadó

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biofizikai Intézet

Dr. Tubak Vilmos, tudományos igazgató

Creative Labor Kft.



Szeged

2018

1. Bevezetés

A soksejtű szövetes szervezeteket különböző, hámszöveti sejtek alkotta gátrendszerek határolják. A legnagyobb külső határfelületnek tekinthető barrier a bélcsatorna nyálkahártyája, amely megakadályozza, hogy anyagok, bélbaktériumok, vagy kórokozók szabadon jussanak a szervezetbe, ugyanakkor felszint biztosít a táplálékfelvételhez és az emésztéshez. Az egyik legfontosabb vér-szöveti gátrendszerünk a központi idegrendszer ionos homeosztázisát és az idegsejtek megfelelő tápanyag-ellátottságát ellátó vér-agy gát. Mindkét barrier anatómiai alapját az epitél-, illetve az endotélsejteket egymáshoz kapcsoló szoros kapcsolatok képezik (**1. táblázat**), melyek fizikailag megakadályozzák anyagok sejtek közti átjutását és a gátrendszerek sejteinek polaritást adva biztosítják az anyagok szabályozott transzportját.

1. táblázat. Az intesztinális és a vér-agy gát felépítésének összehasonlítása (Deli, 2009 alapján)

	Bélepitélium	Vér-agy gát endotélum
Gátrendszer	külső	belső
Apikális/luminális független	mikrovillus , glikokalix	glikokalix
Szoros kapcsolatot (TJ) kialakító fehérjék	okkludin, tricellulin	okkludin, tricellulin
	klaudin-1, -2, -3, -4, -7, -15	klaudin-1, -3, -5, -15
	JAM-A, -B, -C, CAR	JAM-A, -B, -C, CAR, ESAM
Adherens kapcsolatot (AJ) kialakító fehérjék	E -kadherin	VE -kadherin
	nektinek	nektinek, PECAM-1

A gátrendszerek dinamikus határfelületeinek homeosztázist fenntartó és védőfunkciói nemcsak élettani körülmények között fontosak, hanem betegségekben is. A legtöbb kórtani állapotban helyi, vagy akár szisztémás gyulladásos folyamatok figyelhetők meg, amelyek alapvetően befolyásolják a barrierék működését. A gyulladások citokinek közül a TNF- α és az IL-1 β a két leginkább tanulmányozott molekula, melyek részt vesznek gyulladásos bélbetegségekben, valamint központi idegrendszeri gyulladásos folyamatokban is, a gátrendszerek sérülését és áteresztőképességük fokozódását kiváltva. Citokínkárosításos kísérleteinkben ezért ezt a két citokint használtuk.

Az α -melanocita stimuláló hormon (α -MSH) endogén peptid a melanokortinok csoportjába tartozik. A hormon elsődleges és leggyakoribb receptora a melanokortin receptorok (MCR) közül az MC1R G-fehérje kapcsolt molekula (**2. táblázat**), mely a ciklikus 3',5'-adenozin-monofoszfát (cAMP) másodlagos hírvivőn keresztül fejti ki hatását. A hormon

bőr- és szőrszint meghatározó szerepe mellett az allergiás és gyulladásos megbetegedésekben gyakorolt protektív hatása is kiterjedt kutatások tárgyát képezi. Az α -MSH bélrendszert védő hatását írták le akut és krónikus vastagbélgyulladás patkány-modelljein, illetve a bélrendszerben előforduló iszkémiában is. A peptid neuroprotektív hatását figyelték meg bakteriális lipopoliszacharid által kiváltott agyi gyulladásban, agyi érelzáródásban, kainsav kiváltotta, valamint traumás agysérülésekben is.

2. táblázat. Az MCR receptorok jellemzői (Brzoska és mtsai, 2008 és Lasaga és mtsai, 2008 alapján).

Receptor	Kötődési affinitás	Szöveti kifejeződés	Sejttenyészetes kifejeződés	Élettani funkció
MC1R	α -MSH = ACTH = β -MSH \gg γ -MSH	bőr, agy, bél, here, méhlepény, tüdő, máj	melanocita, endotélsejt, asztrocita, bél-epitélium, immunsejtek	pigment-termelés, gyulladás
MC2R	ACTH	mellékvese, here, bőr	zsírsejt, keratinocita	szteroid-szintézis
MC3R	γ -MSH = ACTH = β -MSH \geq α -MSH	agy, szív, vázizom	bélepitélium, immunsejtek	energia-háztartás, gyulladás
MC4R	α -MSH = ACTH = β -MSH \gg γ -MSH	agy, bőr, vázizom	dendritikus sejt	energia-háztartás, erekció, gyulladás
MC5R	α -MSH \geq β -MSH = ACTH $>$ γ -MSH	vázizom, agy, bőr, mirigysejt, tüdő, szív	zsírsejt, mirigysejtek, bél-epitélium	mirigy-működés

2. Célkitűzések

Az α -MSH gyulladáscsökkentő és jótékony hatását már számos, elsősorban állatkísérletes eredmény bizonyítja, azonban annak biológiai gátrendszerek működésére gyakorolt hatását még nem vizsgálták részleteiben. Célunk ezért az volt, hogy megvizsgáljuk (i) kifejeződik-e a bélepitélium és a vér-agy gát tenyészetes modelljein az MC1R, (ii) milyen közvetlen hatása van az α -MSH peptidnek az agyi endotélsejtek életképességére, (iii) hogyan befolyásolja a hormon a gyulladáskeltő citokinek hatását a biológiai gátrendszerek tenyészetes modelljeinek áteresztőképességére és a sejteket összekötő szoros kapcsolatok morfológiájára, (iv) és gátolja-e az NF- κ B transzkripció faktor sejtmagi bejutását a modellekben, illetve reaktív oxigéngyökök képződését tenyésztett agyi endotélsejtekben.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejttenyésztés

3.1.1. A humán Caco-2 bélepitél-sejtvonal tenyésztése

A bélepitélrium modellezésére a humán Caco-2 béleredetű adenokarcinóma sejtvonalat az ECACC cégtől (#86010202; European Collection of Authenticated Cell Cultures, Egyesült Királyság) szereztük be. A sejtvonalat 10% borjúsavóval (FBS) és gentamicinnel (50 µg/ml) kiegészített tápfolyadékban (Dulbecco módosította Eagle-médium, DMEM) tenyésztettük. A tenyésztési felületeket patkányfarok ínból kinyert kollagénnel vontuk be, hogy a sejtek letapadását és növekedését elősegítsük.

A bélepitélrium gátműködésének vizsgálatához a sejtvonalat permeábilis polikarbonát membránokra (0,4 µm pórusméret, 0,33 felszín; Transwell, Corning Costar, USA) szélesztettük és tenyésztettük.

3.1.2. A vér-agy gát *in vitro* modellezése

A vér-agy gát modellezésére primer patkány agyi endotélrium egysejtrétegét, valamint a permeabilitási teszthez és a sejtkapcsoló fehérjék immunfestéséhez három sejttypusból álló ko-kultúra modellt használtuk, ahol primer patkány agyi endotél-, glia- és pericita sejteket tenyésztettünk együtt. A különböző sejttypusok izolálásának és a modellek összeállításának lépéseit kutatócsoportunk már számos tudományos közleményben leírta (Nakagawa és mtsai, 2009; Veszelka és mtsai, 2013; Walter és mtsai, 2015).

A ko-kultúra modellhez a tenyésztőbetétek poliészter membránjának (0,4 µm pórusméret, 1,12 cm² felszín; Transwell, Corning Costar, USA) alsó, ún. abluminális felszínére pericitákat szélesztettünk, majd hagytuk a sejteket letapadni 3 órán keresztül 37 °C-on. Ezután a tenyésztőbetéteket a 12-lyukú lemezekben található gliasejtek fölé helyeztük, és a membránok felső, ún. luminális oldalára endotélsejteket pipettáztunk. A három sejttypust ezt követően 3-5 napig tenyésztettük együtt.

3.2. Tenyészetek kezelése

A kísérleteink során a sejttypusok érzékenységét figyelembe vettük, ezért a humán Caco-2 sejtvonalat 10⁻¹⁶ M (100 aM), 10⁻¹² M (1 pM), 10⁻⁸ M (10 nM) és 10⁻⁴ M (100 µM) koncentrációjú α-MSH peptiddel kezeltük. A citokinkárosító kísérletekben 25 ng/ml IL-1β és 50 ng/ml TNF-α koncentrációt alkalmaztunk (Van De Walle és mtsai, 2010), míg α-MSH-ból a leghatékonyabb 10⁻⁸ M (10 nM) koncentrációt.

A patkány agyi endotélsejtek esetében a 10^{-12} M (1 pM), 10^{-11} M (10 pM), 10^{-10} M (100 pM), 10^{-8} M (10 nM) és 10^{-6} M (1 μ M) α -MSH koncentrációkat vizsgáltuk. A citokinkárosítást a Caco-2 sejtvonalhoz használt koncentrációkból kiindulva különböző kombinációban végeztük: 25 ng/ml IL-1 β + 50 ng/ml TNF- α , 25 ng/ml IL-1 β + 25 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IL-1 β + 25 ng/ml TNF- α , valamint 10 ng/ml IL-1 β + 10 ng/ml TNF- α kombinációkkal kezeltük az agyi endotélsejteket. A további kísérletekhez a leghatékonyabb 10^{-12} M (1 pM) és 10^{-11} M (10 pM) α -MSH és a legalacsonyabb 10 ng/ml IL-1 β + 10 ng/ml TNF- α koncentrációkat alkalmaztuk.

A kontrollcsoport mindkét modellnél kezelést nem, csak tápfolyadékot kapott, azonban minden más körülményben azonosan tenyésztett és vizsgált sejteket tartalmazott.

3.3. Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció

Az *Mclr* gén aktivitásának vizsgálatához agyi mikroereket izoláltunk Wistar patkányokból, valamint patkány agyi endotélsejteket tenyésztettünk 6 cm-es Petri-csészékben (Corning Costar, USA). PBS-mosást követően a szövet- és a sejtmintákat TRI reagensben (Molecular Research Center, USA) homogenizáltuk. Ezt követően a gyártó protokollja szerint az össz-RNS-t kloroformmal kivontuk, majd az össz-RNS-ek 1-1 μ g-ját DNáz enzimmel (ThermoFisher, USA) kezeltük, ezután cDNS-szintézis kit (ThermoFisher, USA) segítségével reverz transzkripciót végeztünk a gyártó utasításainak megfelelően.

3.4. Életképességi vizsgálatok

Az α -MSH patkány agyi endotélsejtek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálatára festékredukciós (MTT) és valósidejű sejtanalízisen alapuló (RTCA-SP) módszereket használtunk. A MTT-teszthez az agyi endotélsejteket 96-lyukú lemezekben tenyésztettük (5×10^3 sejt/lyuk kiindulási sejtszám), amíg be nem nőttek a tenyésztőfelületet. Ezt követően a sejteket 24 órán keresztül különböző koncentrációjú α -MSH-val kezeltük. A kezelés után a sejtekhez adtuk az MTT-oldatot (0,5 mg/ml) és 3 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. A festékből képződött formazánkristályokat dimetil-szulfoxidban oldottuk fel és a formazán mennyiségét abszorbanciaméréssel határoztuk meg többlyukú lemezleolvasó készülék segítségével.

Az impedancia-méréseken alapuló sejtanalízisnél (RTCA-SP műszer, ACEA Biosciences, USA) a vizsgálatok fiziológiás körülmények között zajlanak folyamatos monitorozás mellett. A kísérlethez az E-plate lemezek lyukait IV. típusú kollagénnel (100 μ g/ml) és fibronectinnel (100 μ g/ml) vontuk be, majd UV alatt történő szárítást követően

tápfolyadék hozzáadása után lemértük a háttér-impedanciát. Ezt követően mértük a lyukakba a sejtszuspenziót (5×10^3 sejt/lyuk kiindulási sejtszám), majd az agyi endotélsejteket 37°C -os CO_2 -inkubátorban tenyésztettük, amíg a sejtek benőtték a tenyésztőfelszínt, és az impedancia nem nőtt tovább (platófázis). Ekkor a sejteket vagy α -MSH peptiddel (10^{-12} - 10^{-6} M), vagy egyórás α -MSH (10^{-12} - 10^{-11} M) előkezelést követően IL- 1β és TNF- α (10-10 ng/ml) citokinekkal kezeltük. A műszer a sejtinindexet ezután 24 órán keresztül 10 percenként rögzítette. Az impedanciaértékeket a kezelés előtti utolsó időpont értékeihez normalizáltuk és a kapott értékeket az idő függvényében ábrázoltuk.

3.5. Biológiai gátrendszerek működésének vizsgálata

3.5.1. Transzeptitális elektromos ellenállás mérése

A bélepitelsejtek közötti szoros sejtkapcsoló struktúrák korlátozzák az anyagok paracelluláris átjutását. A tenyészetekben mért transzeptitális elektromos ellenállás (TEER) értékek a sejtek szoros kapcsolatainak szorosságát tükrözik ionokra. A humán Caco-2 sejtvonal ellenállásértékeit Millicell-ERS rezisztenciamérővel és mérőelektroddal (Millipore, USA) vizsgáltuk. A mért TEER-értékeket a sejtmentes filter ellenállásértékének levonását követően a tenyésztőmembrán felszínéhez viszonyítva ($\Omega \times \text{cm}^2$) átlagoltuk és ábrázoltuk.

3.5.2. Permeabilitási vizsgálat

A gátrendszerek modelljeinek permeabilitási vizsgálatát különböző nagyságú jelzőanyagok használatával végeztük. A paracelluláris útvonalon való átjutás mértékének meghatározása humán Caco-2 bélepitelsejtréteg esetében fluoreszcein (SF, 376 Da), patkány vér-agy gát ko-kultúra modell esetében fluoreszcein-izotiocianáttal jelölt dextrans (FITC-dextrán, 4,4 kDa) segítségével történt. A másik marker a szérum albumin volt, ami az Evans-kék festékkel komplexet alkot (EBA, 67 kDa).

A Caco-2 bélepitelsejteket 24 órán át kezeltük IL- 1β és TNF- α citokinekkal α -MSH hozzáadásával vagy anélkül. A primer patkány sejtekből álló vér-agy gát ko-kultúra modellt 1 órán át kezeltük gyulladásokeltő citokinekkal α -MSH jelenlétében vagy anélkül. A jelzőanyagok koncentrációját a felső és az alsó kompartmentekből vett mintákból többlyukú lemezleolvasóval határoztuk meg. A kapott eredményeket a látszólagos permeabilitási együttható (P_{app}) segítségével fejeztük ki.

3.6. Reaktív oxigéngyök képződés

Az agyi endotélsejtekben a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződésének meghatározására a 2',7'-dikloro-dihidro-fluoreszcein diacetát próbát használtunk. A patkány agyi endotélsejteket α -MSH-val és gyulladásokeltő citokinekkal önállóan és együtt kezeltük 96-lyukú tenyésztőlemezeken 1 órán keresztül. A kezelőoldatokat DCFDA-t (2 μ M) tartalmazó Ringer-HEPES oldatra cseréltük és a sejteket újabb 1 órán át inkubáltuk, miközben 5 percenként fluoreszcencia-intenzitást mértünk fluoreszcens leolvasó készülékkel. Referencia-vegyületként hidrogén-peroxid oldatot (100 μ M) használtunk.

3.7. Immunhisztokémia

Az MC1R receptor, a klaudin-4 integráns membrán TJ fehérje, a ZO-1 linkerfehérje és a NF- κ B transzkripciós faktor immunfestéséhez a Caco-2 epitélisejtek tenyészeit PBS-mosást követően fixáltuk. A nem specifikus kötőhelyeket 3% BSA-val blokkoltuk. A nyúl anti-humán MC1R (1 μ g/ml), nyúl anti-humán ZO-1 és nyúl anti-humán klaudin-4 (2,5 μ g/ml; Thermo Fisher Scientific, USA), valamint a nyúl anti-humán NF- κ B elsődleges ellenanyagokkal (2,5 μ g/ml; Santa Cruz Biotechnology, USA) egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk a mintákat. Másodlagos ellenanyagként Alexa Fluor 488 jelölt anti-nyúl és Cy3-jelölt anti-nyúl másodlagos ellenanyagokat használtunk (2 μ g/ml) propídium-jodid (1 μ M) vagy H33342 (1 μ g/ml) sejtmagfestékekkel együtt. A mintákat lefedést (Fluoromount-G, Southern Biotech, USA) követően Olympus FV1000 (Olympus Corporation, Japán) és Leica SP5 konfokális mikroszkóp (Leica Camera AG, Németország) segítségével vizsgáltuk.

Az agyi pericitákkal és a gliasejtekkel együtt tenyésztett patkány agyi endotélsejteket és a frissen izolált patkány agyi hajszálereket PBS-mosást követően fixáltuk, a nem specifikus kötőhelyeket blokkoltuk és nyúl anti-humán MC1R elsődleges ellenanyaggal (5 μ g/ml) egy éjszakán keresztül 4 °C-on inkubáltuk. Másodlagos ellenanyagként az Alexa Fluor 488 jelölt anti-nyúl ellenanyagot (2,5 μ g/ml) használtunk etídium-homodimer (1 μ M) sejtmagfestékekkel.

A sejtkapcsoló fehérjék és az NF- κ B festődés vizsgálatához az agyi pericitákkal és a gliasejtekkel együtt tenyésztett patkány agyi endotélsejteket a kezelések után PBS-mosást követően fixáltuk, majd a nem specifikus kötőhelyeket blokkoltuk. A nyúl anti-patkány klaudin-5 és a nyúl anti-patkány β -katenin, valamint a nyúl anti-humán NF- κ B elsődleges ellenanyagokkal (2,5 μ g/ml; Santa Cruz Biotechnology, USA) egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk a mintákat. Másnap a Cy3-jelölt anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal (1 μ g/ml) és H33342 (1 μ g/ml) sejtmagfestékekkel 1 órán át kezeltük a mintákat szobahőmérsékleten. A

mintákat lefedést (Fluoromount-G, Southern Biotech, USA) követően Leica SP5 konfokális mikroszkóp (Leica Camera AG, Németország) segítségével vizsgáltuk.

A patkány agyi endotélsejtek festődésváltozásának mennyiségi analízisét MATLAB program (MathWorks, USA) míg a citoplazmás és sejtmagi NF- κ B festődésintenzitás vizsgálatát Caco-2 sejtvonal esetében ZEN 2012 v.1.1.0.0. szoftver (Carl Zeiss AG, Németország), a patkány agyi endotélsejtek esetében ImageJ program (National Institute of Health, USA) segítségével végeztük (Sántha és mtsai, 2016).

3.8. Statisztikai kiértékelés

A statisztikai kiértékeléshez a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, USA) programot használtuk. A kísérletekben kapott adatokat átlag \pm S.E.M. (az átlag standard hibája) formában adtuk meg.

Az életképességi vizsgálatoknál, az immunhisztokémiai festések mennyiségi analízisének és a ROS-termelődés vizsgálatánál varianciaanalízist követően Dunnett- és Bonferroni-teszteket végeztünk. A transzepiteliális rezisztenciamérésnél és a permeabilitási vizsgálatoknál kétutas ANOVA-t követően Bonferroni-tesztet alkalmaztunk.

Statisztikailag szignifikánsnak a $P < 0.05$ értékeket tekintettük. A kísérleteket legalább háromszor megismételtük, és kísérletenként legalább három párhuzamos mintát használtunk.

4. Eredmények

4.1. MC1R fehérje jelenléte bélepitél- és agyi endotélsejteken

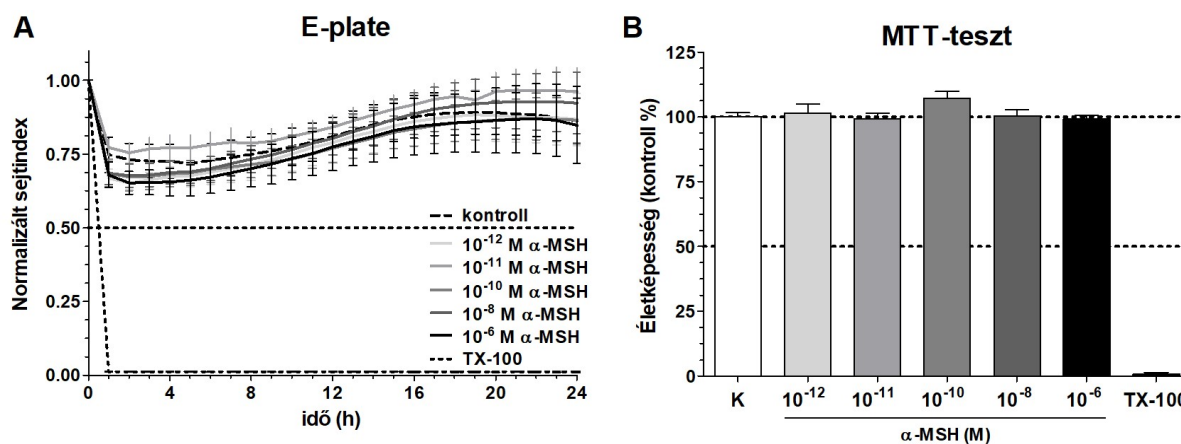
Az α -MSH peptid hatásának közvetítésében szerepet játszó elsődleges receptor az MC1R, melynek kifejeződését sikeresen kimutattuk a biológiai gátrendszerek mindkét tenyésztési modelljén.

A Caco-2 bélepitélsejtekben mind az apikális, mind a bazális felszínen kimutatható volt a receptorfehérje jelenléte immunhisztokémiai festéssel. A fluoreszcens festődés sokkal kifejezettebbnek bizonyult az apikális felszínen a bazális oldalhoz viszonyítva, ami a konfokális mikroszkóppal készített képekből összerakott horizontális metszeten is jól látszott.

Az MC1R gén termékét mind a tenyésztett patkány agyi endotélsejtekben, mind az izolált patkány agyi mikroerekben kimutattuk reverz transzkripciót követő PCR segítségével. A génaktivitási vizsgálat eredményét igazolta az MC1R immunhisztokémiai festés is, ahol mind a tenyésztett endotélsejtekben, mind az izolált agyi hajszálerek endotélsejtjeiben jól látható jelet kaptunk.

4.2. Az α -MSH hatása agyi endotélsejt-tenyészeteken

Az α -MSH peptid patkány agyi endotélsejtekre gyakorolt önálló hatását impedanciaalapú valósídejű sejtanalízissel és végponti analízist lehetővé tevő MTT-tesztel vizsgáltuk. Különböző koncentrációjú (1 pM - 1 μ M) 24 órás peptidkezelés nem változtatta meg szignifikánsan a sejtek életképességét. Az impedancia-mérések során a kezelt agyi endotélsejtek görbéi a kezeletlen kontrollcsoport görbéivel futottak együtt (**1A ábra**), ami életképes, a felszínre jól letapadt, egymáshoz szorosan kapcsolódó sejtekből álló tenyészetekre utalt. Mindezt megerősítette az MTT-teszt eredménye, amellyel semmilyen metabolikus aktivitásban bekövetkezett változást nem mutattunk ki a kezeletlen kontrollcsoportéhoz viszonyítva 24 órás α -MSH-kezelést követően (**1B ábra**). Az eredmények alapján a patkány agyi endotélsejtek további kísérleteinkben 10^{-12} M (1 pM) és 10^{-11} M (10 pM) koncentrációjú α -MSH-kezelést alkalmaztunk, amely tartomány megfelel a neurohormon vérben mérhető élettani koncentrációinak (Kovács és mtsai, 2001; Magnoni és mtsai, 2003).

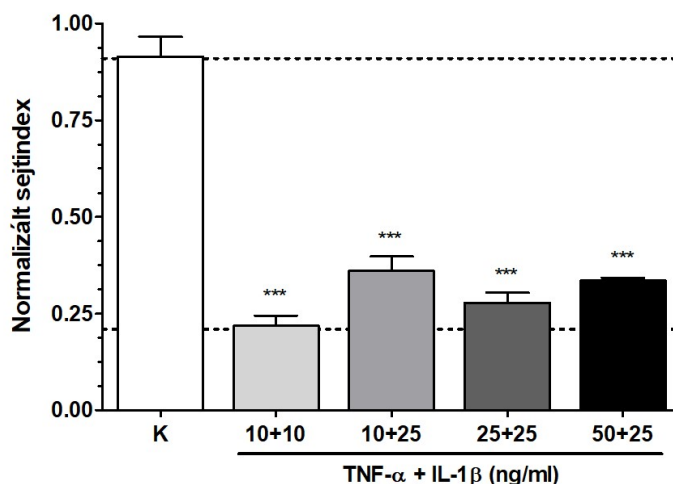


1. ábra. Az α -MSH különböző koncentrációinak hatása tenyésztett patkány agyi endotélsejtek életképességére. **A)** Valósídejű sejtanalízis. **B)** MTT teszt. Statisztika: egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt.

4.3. A citokinek és az α -MSH hatása agyi endotélsejt-tenyészetek életképességére

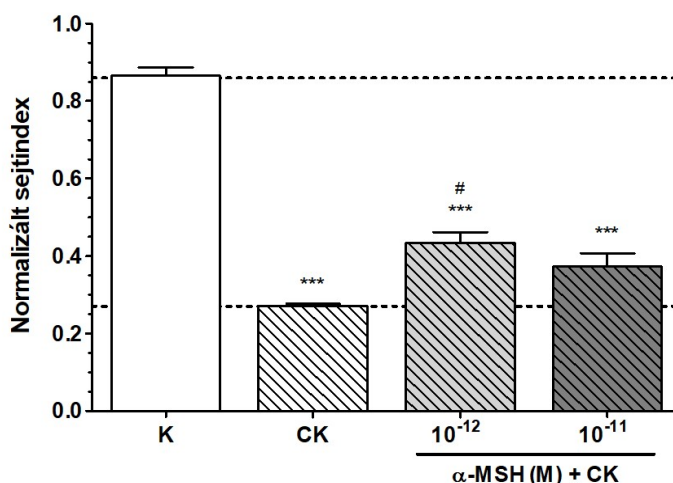
A gyulladásokeltető citokinek megfelelő kezelési koncentrációjának meghatározásához patkány agyi endotélsejteket kezeltünk négy különböző kombinációban: a Caco-2 bélepitélsejtek alkalmazott 50 ng/ml TNF- α és 25 ng/ml IL-1 β koncentrációtól kezdve a 25+25 ng/ml kezelési koncentráción át, az alacsonyabb 10 ng/ml TNF- α és 25 ng/ml IL-1 β és 10+10 ng/ml koncentrációig (**2. ábra**). Mind a négy kezelési kombináció esetén 24 órás kezelést követően statisztikailag szignifikánsan csökkent a patkány agyi endotélsejtek valósídejű sejtanalízis során mérhető sejtinдекse. A négy kezelési csoport hatásai között pedig

nem volt statisztikailag szignifikáns különbség. A patkány agyi endotélsejteken további kísérleteinkben a 10+10 ng/ml koncentrációjú, azonos hatást kiváltó legkisebb koncentrációjú citokinkezelést alkalmaztuk.



2. ábra. Különböző koncentrációjú citokinkoktélok hatása tenyésztett patkány agyi endotélsejtek életképességére. Statisztika: ***, $P < 0,001$ a kontrollcsoporthoz képest, egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt.

Patkány agyi endotélsejteket 10+10 ng/ml TNF- α és IL-1 β kombinációval kezelve 50% alá esett a sejtinдекс, ezt a károsító hatást az α -MSH-kezelés csökkentette (**3. ábra**). Az α -MSH kis koncentrációjú (1 pM) alkalmazása statisztikailag szignifikáns védőhatást mutatott a citokinindukált életképesség-csökkenés ellen (**3. ábra**). A citokinekkal és az α -MSH peptiddel együtt kezelt két kísérleti csoport között nem volt statisztikailag kimutatható különbség.

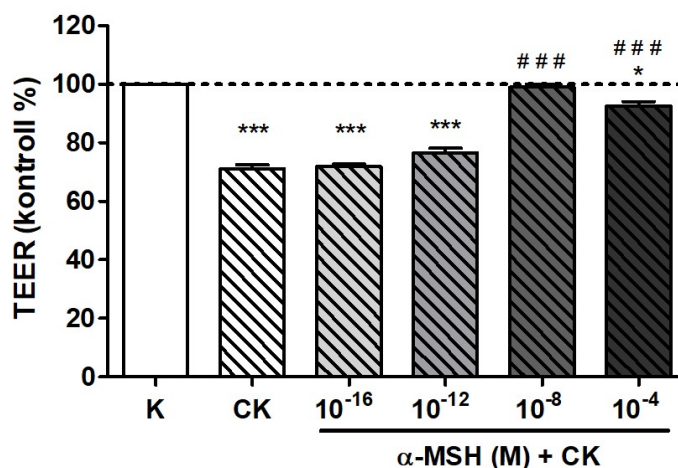


3. ábra. Az α -MSH hatása citokinekkal kezelt tenyésztett patkány agyi endotélsejtek életképességére. Valósídejű sejtanálízis a 24-órás kezelés utáni időpontban. CK: 10 ng/ml TNF- α + 10 ng/ml IL-1 β . Statisztika: ***, $P < 0,001$ a kontrollcsoporthoz képest; #, $P < 0,05$ a citokinkezelt csoporthoz képest, egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt.

4.4. A citokinek és az α -MSH hatása a biológiai gátrendszerek tenyészetes modelljeinek integritására

4.4.1 Transzepiteliális elektromos ellenállás

A biológiai gátrendszereket alkotó epitél- és endotélsejtrétegek szorosságát a sejtréteg két oldala között mérhető magas ellenállás jellemzi. Ennek fizikai alapja, hogy a sejteket összekapcsoló TJ fehérjék megakadályozzák az ionok paracelluláris szabad áramlását. A Caco-2 bélepitél-sejtvonalon alkalmazott citokinkezelés csökkentette a sejtréteg ellenállását (**4. ábra**). A citokinnel együtt adott α -MSH peptidkezelés koncentrációfüggő hatást mutatott. A magasabb (10^{-4} és 10^{-8} M) koncentrációk védtek a citokinindukált ellenálláscsökkenés ellen, míg a kisebb (10^{-12} és 10^{-16} M) koncentrációknak nem volt ilyen hatása. További kísérleteinkben a Caco-2 bél-epitélsejteken a 10^{-8} M (10 nM) koncentrációjú α -MSH-kezelést alkalmaztuk.



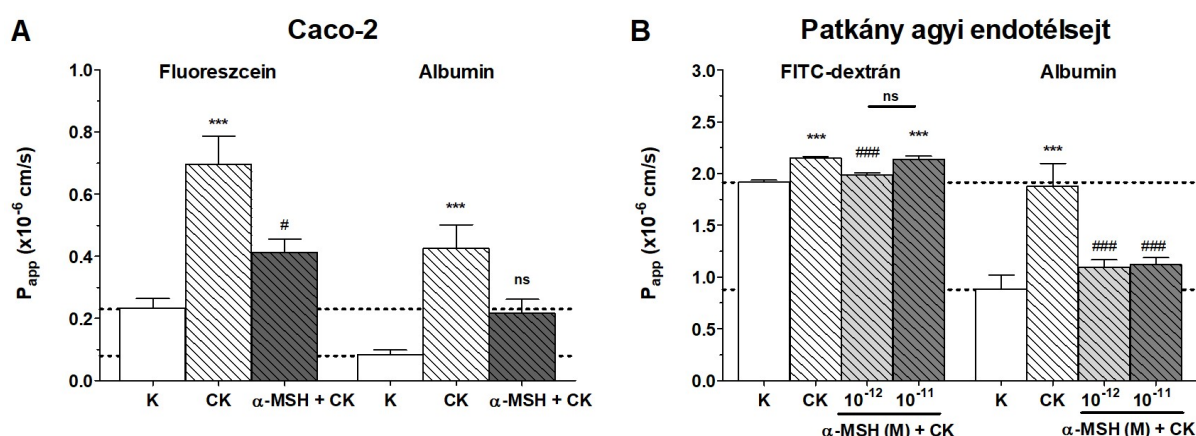
4. ábra. Az α -MSH hatása citokinkezelt Caco-2 bélepitélsejtréteg elektromos ellenállására (TEER). CK: 50 ng/ml TNF- α + 25 ng/ml IL-1 β . Statisztika: ***, $P < 0,001$ a kontrollcsoporthoz képest; ###, $P < 0,001$ a citokinkezelt csoporthoz képest, egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt.

4.4.2. Permeabilitási vizsgálatok

Az epitél- és endotélsejtrétegek integritásának, megfelelő működésének mérésére alkalmas másik módszer a sejtrétegek permeabilitásának vizsgálata különböző méretű jelzőanyagokkal.

Alacsony permeabilitást mértünk mind a kis molekulatömegű fluoreszceinre, mind a nagy molekulatömegű albuminra a bélepitélsejtek egysejtrétegén (**5A ábra**). A citokinkezelés többszörösére emelte a jelzőmolekulák permeabilitását. Az α -MSH peptid védőhatást mutatott a kis molekulatömegű fluoreszcein átjutásának fokozódásával szemben, míg az albumin esetében ez a hatás nem volt statisztikailag szignifikáns.

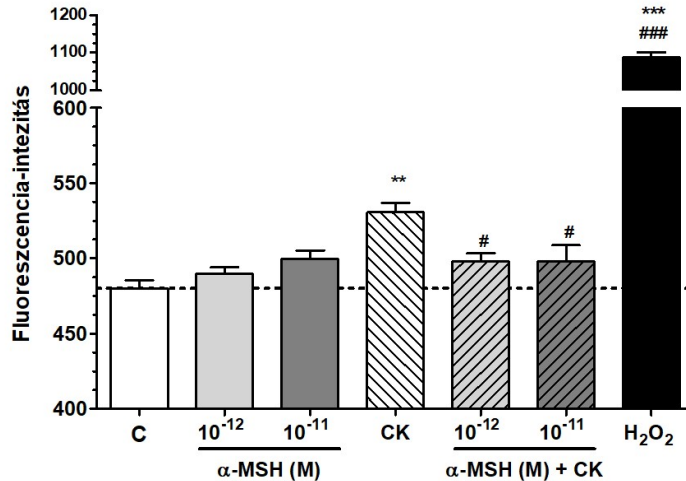
A vér-agy gát modellen hasonló változásokat mértünk. A patkány agyi endotélsejtek agyi pericitákkal és gliasejtekkel történő együttes tenyésztését követően a modellre jellemző alacsony permeabilitást mértünk a dextrán és albumin jelzőmolekulákra (**5B ábra**). A citokinkezelés ezen a tenyészetes modellen is megemelte a markerek átjutását. A 10^{-12} M (1 pM) α -MSH-kezelés statisztikailag szignifikáns mértékben gátolta a citokinek gátmegnyitó hatását mind a kis molekulatömegű FITC-dextránra, mind a nagy molekulatömegű albuminra. A 10^{-11} M (10 pM) koncentrációjú α -MSH pedig szignifikánsan erősítette a sejtréteget, és kivédte a nagyobb biomolekula albumin emelkedett permeabilitását.



5. ábra. Az α -MSH hatása citokinkezelt epitél- és agyi endotélsejt tenyészetek integritására különböző jelzőanyagok esetén. **A)** A Caco-2 bélepitélsejt-réteg fluoreszceinre és albuminra vonatkozó permeabilitása. CK: 50 ng/ml TNF- α + 25 ng/ml IL-1 β . **B)** Patkány agyi endotélsejtréteg 4 kDa FITC-dextránra és albuminra vonatkozó permeabilitása. CK: 10 ng/ml TNF- α + 10 ng/ml IL-1 β . Statisztika: ***, $P < 0,001$ a kontrollcsoportokhoz képest; #, $P < 0,05$, ###, $P < 0,001$ a citokinkezelt csoportokhoz képest; ns, statisztikailag nem szignifikáns különbség a citokinkezelt csoporthoz képest, illetve a jelzett két csoport között, egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt.

4.5. A citokinek és az α -MSH hatása a reaktív oxigéngyökök termelődésére agyi endotélsejtekben

A gyulladásokeltő citokinek hatására szignifikánsan megemelkedett a ROS-termelődés patkány agyi endotélsejtekben a kezeletlen kontrollcsoporthoz képest (**6. ábra**). Az alacsony koncentrációjú α -MSH-kezelés önmagában nem befolyásolta a sejtekben a ROS-termelődést, azonban a citokinekkel kezelt csoportban statisztikailag szignifikáns mértékben csökkentette a ROS mennyiségét. A hidrogén-peroxidot ROS-termelődést fokozó referenciavegyületként használtuk a vizsgálatok során.



6. ábra. Az α -MSH hatása citokinkezelt tenyésztett patkány agyi endotélsejtekben reaktív oxigéngyök-termelődésére. CK: 10 ng/ml TNF- α + 10 ng/ml IL-1 β . Statisztika: **, $P < 0,01$, ***, $P < 0,001$ a kontrollcsoportéhoz képest; #, $P < 0,05$, ###, $P < 0,001$ a citokinkezelt csoportéhoz képest, egyutas ANOVA és Bonferroni-teszt.

4.6. A citokinek és az α -MSH hatása az epitél- és agyi endotélsejtek sejtkapcsoló fehérjéire

4.6.1. Klaudin-4 és ZO-1 immunhisztokémia Caco-2 sejteken

A bélepitélsejtek gátműködésének fizikai alapját a sejtkapcsoló fehérjék képezik. A klaudin-4 integráns sejtmembrán TJ fehérje és a citoplazmatikus ZO-1 linker fehérje a sejthatárokon folytonos, övszerű festődést mutatott. Citokinkezelés hatására az epitélsejtek között lyukak alakultak ki, a kapcsolófehérje-festődés felszakadozott és a ZO-1 immunfestés esetében citoplazmatikus átrendeződés volt megfigyelhető. Az α -MSH peptidkezelés hatására a TJ fehérjék immunfestése a kontrollcsoportéhoz hasonló mintázatot mutatott.

4.6.2. A klaudin-5 és β -katenin festődése patkány agyi endotélsejtekben

A patkány agyi endotélsejtekben a szoros kapcsolatot képező klaudin-5 és az adherens kapcsolatok linker fehérjéje, a β -katenin festődése a sejthatárokon erős és folytonos volt, amelyet a citokinkezelés megváltoztatott: a sejtek között lyukakat, a sejten belül fehérje-átrendeződést figyeltünk meg. Az α -MSH peptiddel történő együttes kezelés hatására a kapcsolófehérjék festődési mintázata a kontrollcsoportéhoz hasonló volt.

Az immunfestésben látott változásokat képkiértékelő program segítségével is számszerűsítettük mind a klaudin-5, mind a β -katenin esetében. A citokinkezelés hatására statisztikailag szignifikánsan megemelkedett konfokális mikroszkópos felvételeken az immunfestéssel jelölődő objektumok száma, míg α -MSH hatására az objektumszám szignifikánsan csökkent a citokinkezelt csoportokhoz képest.

4.7. A citokinek és az α -MSH hatása az NF- κ B sejtmagi bejutására bélepitél- és agyi endotélsejtekben

A sejszintű gyulladásos válasz kimutatásának megbízható módja az NF- κ B transzkripciós faktor p65 alegységének sejtmagba történő bejutásának nyomon követése.

Caco-2 bélepitélsejtekben a kontrollcsoportban a p65 alegység a citoplazmában volt megfigyelhető, és a sejtmagi és citoplazmatikus immunfestődés intenzitásának hányadosa alacsony volt. Citokinkezelés hatására a p65 alegység fluoreszcens jele intenzívebb lett a sejtmagban, ami az intenzitáshányados szignifikáns megemelkedését eredményezte. Az α -MSH-kezelés statisztikailag szignifikánsan csökkentette az intenzitáshányadost, azaz gátolta az NF- κ B p65 alegység sejtmagba történő bejutását.

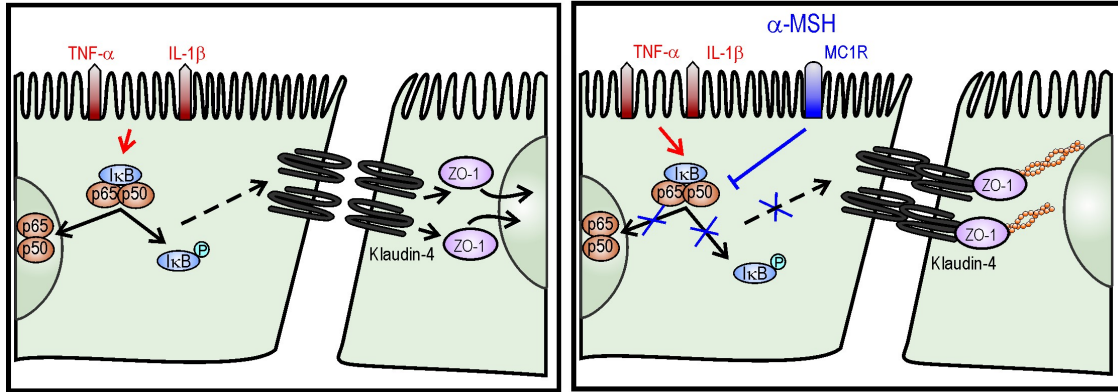
Patkány agyi endotélsejtekben is intenzívebb lett citokinkezelés hatására az NF- κ B p65 alegységének sejtmagi festődése, amelyet számítógépes programmal végzett képiértékeléssel is igazoltunk. Az endotélsejtek kezelése α -MSH peptiddel gátolta a p65 alegység sejtmagba történő bejutását, ezt jelezte a fehérje sejtmagi festődésének statisztikailag szignifikánsan csökkent intenzitása a citokinkezelt csoporthoz képest.

5. Összefoglalás

A biológiai gátrendszerek védelme elsődleges fontosságú az élő szervezetek szempontjából. Ezek sérülése figyelhető meg különböző gyulladásos folyamatok során is, ahol a felszabaduló gyulladásokeltő citokinek, mint a TNF- α és az IL-1 β , a barrierék sérülését okozzák. Mind az intesztinális, mind a központi idegrendszeri sérülések során leírták e két citokin kulcsszerepét, hogy hozzájárulnak a gátrendszerek sejtjeit egymáshoz fűző TJ fehérjék átrendeződéséhez, ezáltal csökkentik a barrier ellenállását és növelik annak áteresztőképességét. A gyulladásokeltő citokinek biológiai gátakat károsító hatásában az oxidatív stressz is kiváltó tényező.

Az α -MSH peptid gyulladásos folyamatokkal szembeni védőhatását számos állatkísérletes modellen és sejttypusban leírták korábban, de Caco-2 bélepitélsejteken és agyi endotélsejteken eddig nem állt rendelkezésre adat. Munkánk során bizonyítottuk, hogy az α -MSH elsődleges receptorának tekinthető MC1R fehérje mind a humán Caco-2 bélepitél-sejtvonalon, mind patkány agyi endotélsejteken kifejeződik, és az utóbbi sejtekre széles koncentrációtartományban sincs károsító hatása.

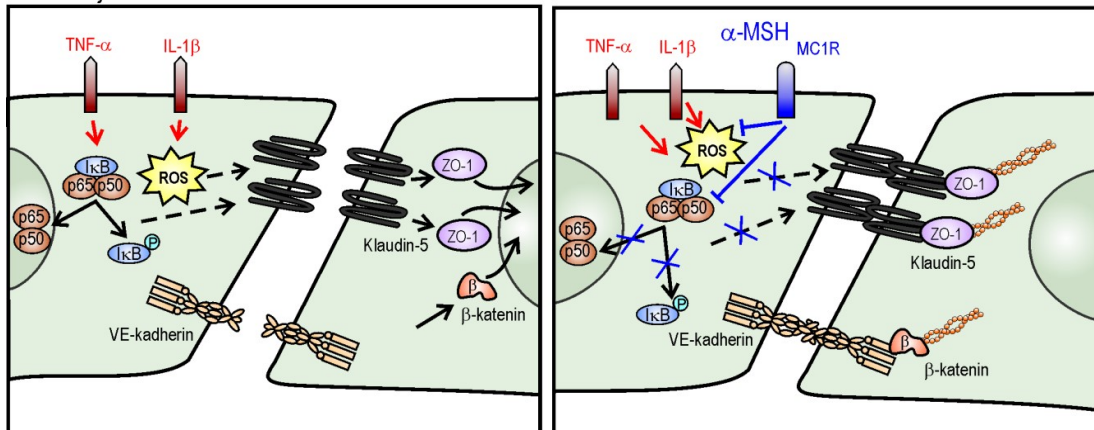
Epitélsejt



7. ábra. Az α -MSH gyulladáscsökkentő hatása bélepitélsejtekben: az NF- κ B transzkripciós faktor aktiválódásának gátlása, a sejtkapcsoló fehérjék kifejeződésének és lokalizációjának elősegítése, ezzel a fokozott permeabilitás csökkentése.

Gyulladásos körülmények között kimutattuk, hogy az α -MSH peptid mind a bélepitélum (7. ábra), mind a vér-agy gát tenyészetes modelljein védőhatású (8. ábra). Az α -MSH az NF- κ B jelátviteli útvonal gátlásán keresztül csökkentette agyi endotélsejtekben az oxigéngyökök termelődését, és mindkét modellen mérsékelte a citokinek okozta permeabilitásfokozódást, valamint az ezzel párhuzamosan kialakuló változást a sejtkapcsoló fehérjék immunfestődési mintázatában. Az általunk vizsgált két biológiai gátrendszer tenyészetes modelljein tehát az α -MSH peptid, legalábbis részben, az NF- κ B fehérje sejtmagba történő bejutásának gátlásával biztosítja a sejtkapcsoló fehérjék kifejeződésének és a barrierék megfelelő működésének visszaállását citokinek okozta károsodásban.

Endotélsejt



8. ábra. Az α -MSH gyulladáscsökkentő hatása agyi endotélsejtekben: a ROS-termelődés, és az NF- κ B transzkripciós faktor aktiválódásának gátlása, a sejtkapcsoló fehérjék kifejeződésének és lokalizációjának elősegítése, ezzel a fokozott permeabilitás csökkentése.

Mindezek az eredmények megerősítik az α -MSH hormon jótékony hatását a biológiai barrierék védelmében.

Publikációs lista:

MTMT azonosító: 10052432

Kumulatív hatástényező (IF): 4,983

A tézis tárgyához tartozó publikációk

- I. Váradi J, **Harazin A**, Fenyvesi F, Réti-Nagy K, Gogolák P, Vámosi G, Bácskay I, Fehér P, Ujhelyi Z, Vasvári G, Róka E, Haines D, Deli MA, Vecsernyés M.
Alpha-melanocyte stimulating hormone protects against cytokine-induced barrier damage in Caco-2 intestinal epithelial monolayers.
PLoS One. 12:e0170537 (2017)
IF: 2,806
- II. **Harazin A**, Bocsik A, Barna L, Kincses A, Váradi J, Fenyvesi F, Tubak V, Deli MA, Vecsernyés M.
Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by alpha-melanocyte stimulating hormone.
PeerJ, 6:e4774 (2018)
IF: 2,177

A tézis tárgyához közvetlenül nem tartozó publikáció

- III. Lénárt N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Tóth ME, **Harazin A**, Tóth AE, Vizler C, Török Z, Pilbat AM, Vígh L, Puskás LG, Sántha M, Deli MA.
Cultured cells of the blood-brain barrier from apolipoprotein B-100 transgenic mice: effects of oxidized low-density lipoprotein treatment.
Fluids and Barriers of the CNS. 12:17 (2015)
IF: -

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Deli Máriának és Dr. Tubak Vilmosnak a munkám során nyújtott szakmai irányításért és szüntelen támogatásért.

Szeretném megköszönni együttműködő partnereinknek, akik lehetővé tették a közös cikkek publikálását. Hálás köszönet Dr. Vecsernyés Miklósnak és a Debreceni Egyetem Gyógyszertechnológiai Intézet munkatársainak az együtt végzett közös munkáért és szakmai támogatásért.

Köszönetet mondok a Biológiai Barrierék Kutatócsoport valamennyi jelenlegi és egykori munkatársainak, Dr. Kürtiné Bocsik Alexandrának, Dr. Hoyk Zsófiának, Dr. Walter Fruzsínának, Barna Lillának, Vigh Juditnak, Dr. Veszeka Szilviának, Mészáros Máriának, Gróf Ilonának, Ana Raquel Pato Santa Mariának, Dr. Sántha Petrának, Dr. Kiss Lórándnak, Dr. Tóth Andreának, valamint Sütöri Balázs és Bálint Armand hallgatóinknak a baráti légkörért és a rengeteg szakmai támogatásért, segítségért.

Külön köszönet illeti a Creative Labor Kft. munkatársait, Váczi Balázst, Kovács Ritát, Kereső Juditot és Simon Ferencné Anikót barátságukért és az egyetemi tanulmányaim során nyújtott támogatásukért.

Köszönöm Dr. Ormos Pálnak és Dr. Nagy Ferencnek, az MTA SZBK főigazgatóinak, Dr. Zimányi Lászlónak, a Biofizikai Intézet igazgatójának és Dr. Siklós Lászlónak, a Molekuláris Neurobiológiai Kutatóegység vezetőjének, hogy lehetővé tették az intézetben való munkámat. Köszönöm a kutatóegység, a Biofizikai Intézet és az egész kutatóközpont minden munkatársának támogatását. Külön szeretném megköszönni Tóth Sándorné Marikának, Dr. Ferenc Györgyinek, Kincses Andrásnak, Melczer Zsófiának, Verebes Beátának, Dr. Vizler Csabának, Jósvay Katalinnak, Dr. Marton Annamáriának és Buhala Andreának barátságukat és támogatásukat.

Hálás vagyok továbbá Dr. Ábrahám Csongor páratlan szakmai támogatásáért és odafigyeléséért.

Kimondhatatlanul hálás vagyok barátaimnak az egyetemi és a doktori éveim alatt adott biztatásukért, szeretetükért, hogy hittek bennem és támogattak.

Végezetül mélységes hálát érzek Nagymamám és Édesanyám szerető iránymutatásáért, Apukám, Öcsém, Nagybátyám, Felesége és Lánya feltétlen támogatásáért és szeretetéért.